Vicentini (Arrigo) 19

A differenza dell'acido cloridrico, e così del bromidrico e jodidrico, è noto però come l'acido fluoridrico non venga ossidato dal permanganato potassico, che può ricristallizzarsi inalterato dall'acido fluoridrico puro [1], in accordo col fatto che fra gli svariati metodi di purificazione dell'acido fluoridrico grezzo è stata anche proposta la distillazione di quest'ultimo per l'appunto in presenza di permanganato [2].

Volendo partire dal permanganato potassico per la preparazione del fluomanganito, occorreva perciò far agire, sulla miscela, permanganato, acido fluoridrico, fluoruro potassico, un'opportuna sostanza riducente. Non si è prestato a questo ufficio un sale manganoso, perchè questo, aggiunto alla miscela suddetta, come hanno provato Müller e Kopp [3], porta alla formazione del fluosale $Mn Fl_5 K_2$ derivato dal manganese trivalente, secondo l'equazione:

$$Mn O^{4'} + 4 Mn^{\cdot\cdot} + 8 H^{\cdot} \longrightarrow 5 Mn^{\cdot\cdot\cdot} + 4 H^2O$$

che costituisce, come è noto, data la presenza dell'acido fluoridrico, una considerevole eccezione alla determinazione volumetrica Volhard dei sali manganosi col permanganato potassico.

La sostanza riducente che ho trovato prestarsi nel miglior modo alla preparazione del fluomanganito, è il comune etere solforico. Tale preparazione si effettua nel modo seguente:

In una spaziosa capsula di platino si pongono due grammi di permanganato potassico, molto finemente polverizzato; 20 cmc. di soluzione di acido fluoridrico al 40 % (quale proviene dalla casa Merck), e due grammi di fluoruro potassico. Con una spatola di platino o di ebanite si agita bene il liquido curando che il permanganato passi in soluzione. Raffreddando poi esternamente la capsula di platino (tenendola immersa in acqua), si fà pervenire da una buretta, nell'interno della capsula, l'etere solforico a goccia a goccia, rimuovendo continuamente il liquido reagente. L'aggiunta dell'etere va fatta lentamente, sempre a goccia a goccia e sospendendola di tanto in tanto: si prosegue fino a che rimangono in soluzione piccole quantità di permanganato rivelabili dal colore rosso-pallido che assume il liquido. Si rimuove ancora la massa per assicurarsi che tutto il permanganato sia passato in soluzione; nel caso contrario, si aggiunge ancora etere, e si lascia poi per qualche minuto in riposo. In tal modo, nel fondo della capsula si raccoglie un abbondante precipitato di un bel colore giallo, di struttura microcristallina, il quale si lascia facilmente e completamente separare per decantazione dal liquido fluoridrico sovrastante, colorato in bruno-rossastro. Si lava un paio di volte per decantazione tale precipitato, con acqua fortemente fluoridrica, rimuovendolo bene

(1) Weinland e Lauenstein (loc. cit.).
(2) Thorpe e Hambly, Journ. Chemic Society, 55. pag. 166 (1889).
(3) Zeitschr. f. anorgan. Chem. *68*. 160 (1910).

in seno a questa; si raccoglie quindi su carta, e si pone in essiccatore su acido solforico.

Tale preparazione richiede, al massimo, dieci minuti di tempo e con ottimo rendimento permette di preparare quantità qualsiasi di fluomanganito corrispondente, all'analisi ed in tutte le proprietà, con quello descritto da Weinland e Lauenstein (loc. cit.). Il fluomanganito $MnFl_6K_2$ può essere ricristallizzato sciogliendolo a caldo nella soluzione di acido fluoridrico al 40 %, purchè quest'ultima sia rigorosamente esente di sostanze organiche. L'acido fluoridrico ne scioglie poco; tuttavia, insistendo, può così ottenersi in bei cristallini giallo d'oro.

La preparazione ora indicata procede bene con l'etere solforico ordinario, purchè non molto ricco di alcool; avviene anche con l'etere solforico purissimo. Se, in luogo dell'etere solforico, si impiegano, con le stesse cautele, alcool etilico, acido acetico, acetone, od ac. formico, non si riesce a fermare nettamente la riduzione al manganese tetravalente, ma si ottiene senz'altro abbondantemente il fluosale color rosa $MnFl_5K_2$, derivato dal manganese trivalente.

Patologia. — *Ricerche morfologiche, culturali e biologiche sulla Leishmania della leishmaniosi spontanea del cane* [1]. Nota del dott. Arrigo Visentini, presentata dal Socio B. Grassi.

Le ricerche che sono oggetto di questa Nota sono state compiute con un ceppo culturale di *Leishmania* in mezzo Novy-Mac Neal-Nicolle, gentilmente inviatami dal Basile al IV trapianto e da lui isolata da un cane affètto da leishmaniosi spontanea. Le osservazioni di confronto riguardano alcuni altri ceppi isolati dall'uomo, già da me posseduti e che sono stati oggetto di studio in precedenza.

Io mi sono già occupato, infatti, della fina struttura della *Leishmania* del Kala-Azar italiano in cultura, ed ho descritto minutamente il processo di divisione di questo parassita nella forma di *Herpetomonas*. Mi auguravo, allora, che, ripetendo analoghe ricerche su altri parassiti, si sarebbero potuti trovare caratteri distintivi atti a differenziare specie da specie.

Usando gli stessi procedimenti di fissazione e di colorazione, io non sono invece riuscito a mettere in evidenza differenze apprezzabili tra le *Leishmanie* in cultura provenienti dall'uomo e quelle provenienti dal cane; entro certi limiti di variabilità da parassita a parassita di una stessa cultura, anche la forma e le dimensioni dei varî ceppi di questi protozoi sono

[1] Istituto di anatomia patologica della R. Università di Pavia, diretto dal professore A. Monti.

identiche, come è identica la fina struttura, e si corrispondono perfettamente le dimensioni e la posizione reciproca del nucleo e degli elementi che costituiscono l'apparato motore.

Il nucleo delle forme culturali di *Leishmania* proveniente dal cane è di tipo vescicolare, costituito di membrana, zona del succo nucleare contenente una rete sottile di linina e granuli di cromatina finissimi, cariosoma, centrìolo.

Il nucleo motore ripete anche qui la struttura di un nucleo vero e proprio. Dal blefaroplasto si stacca il rizoplasto, che si continua con il flagello.

Il processo di divisione segue le stesse fasi nei due nuclei: si ha cioè una mitosi senza formazione di un fuso acromatinico. La cromatina, spezzata in granuli e bastoncelli, si dispone da prima in una massa allungata, bernoccoluta, trasversalmente all'asse maggiore del protozoo, contenuta sempre nell'interno della membrana nucleare, che persiste durante tutto il processo. In seguito, la cromatina si raccoglie in due ammassi, ed ha luogo la formazione di una figura di centrodesmosi.

***

Un altro gruppo di ricerche comprende alcuni tentativi di cultura dei ceppi di *Leishmania* dall'uomo e dal cane nel mezzo di Row, soluzione fisiologica emoglobinizzata, tentativi che sono stati coronati da successo.

Riferisco qui in breve il metodo di preparazione del substrato.

Si raccolgono, con le solite regole di antisepsi ed asepsi, 5 cc. di sangue dalla vena marginale dell'orecchio di un coniglio o da una vena superficiale d'un uomo, se si vuol usare sangue umano, e si defibrina il sangue estratto. Per ogni cc. di sangue si aggiungono 8-10 cc. di acqua distillata sterile, allo scopo di sciogliere approssimativamente tutta l'emoglobina. Si può favorire l'emolisi portando più volte il sangue in ghiacciaia e poi di nuovo alla temperatura del laboratorio. Siccome si deve ottenere alla fine un substrato con una concentrazione di Na Cl al 0,8-0,9 %, conviene preparare una soluzione di Na Cl all' 1,2 % sterile, distribuirne 2 cc. in ogni provetta, e poi, messe le provette in bagnomaria a 56° C., aggiungere in ogni provetta 1 cc. della soluzione satura di emoglobina. È inutile ripetere che tutte queste manipolazioni devono essere compiute con le precauzioni atte a garantire la sterilità del substrato. Io mantenevo poi ancora le provette per mezz'ora a 56°, allo scopo di assicurare in certo qual modo la sterilità del substrato e per distruggere ogni traccia di complemento del sangue.

Tanto i ceppi provenienti dall'uomo quanto quello dal cane trapiantati dal mezzo culturale N N N al substrato nutritivo di Row e mantenuti in termostato a 21°-22° C., si svilupparono bene e senza che si potessero stabilire differenze tra i varî ceppi di origine. Le culture, dopo dieci giorni

circa, erano rigogliose, con spiccata tendenza, da parte dei protozoi, a formare rosette; dopo altri dieci giorni, però, si notavano per lo più le caratteristiche delle colture di *Leishmania* che vanno esaurendo il substrato, e, in genere, dopo un mese, non si trovavano che scarse forme ancora mobili.

Per lo più ho usato sangue di coniglio nella preparazione del mezzo nutritivo; ma per uno scopo speciale ho esperimentato pure il sangue di cavia, ed anche con questo ho avuto uno sviluppo dei parassiti; però le colture così ottenute erano meno rigogliose.

Alcuni tubi a bagnomaria avevano raggiunto, per errore, la temperatura di 60°-70°. In due di questi ho seminato le *Leishmanie*, ed anche in essi ho ottenuto, in uno specialmente, un'ottima coltura.

Ho eseguito trapianti di dieci in dieci giorni sempre nel mezzo di Row, e, di solito, ho ottenuto lo sviluppo di nuove colture.

La *Leishmania*, in cultura NNN, sia proveniente dall'uomo, sia dal cane in Italia, può dunque vivere e svilupparsi nel terreno culturale di Row.

***

Una terza serie di ricerche io ho dedicata allo studio del potere patogeno del parassita, preoccupandomi soprattutto di ottenere l'infezione sperimentale del cane mediante le culture di leishmaniosi spontanea di questo animale.

È noto che anche le esperienze di trasmissione del Kala-Azar per mezzo delle forme culturali hanno avuto risultati molto incostanti ed incompleti.

Infatti, iniettando nel peritoneo enormi quantità di culture di *leishmania* del Kala-Azar tunisino, per primo Novy ha ottenuto un'infezione generale nei cani, mentre, prima e dopo di lui, Nicolle e Manceaux, Nicolle e Blaizot hanno sempre avuto risultato negativo, sia con questo metodo di inoculazione, sia per via sottocutanea. Nicolle e Blaizot però sono riusciti ad infettare i cani con le culture, iniettandole direttamente nel torrente circolatorio.

Nelle scimmie (*macacus sinicus* e *cynomolgus*) ebbero risultato positivo Nicolle e Manceaux con iniezioni endoperitoneali, negative con iniezioni sottocutanee. Il Goretti ha avuto insuccesso in un *cercopithecus* per via endoepatica.

Nel gatto i tentativi di infezione con le forme culturali sono stati concordemente negativi (Laveran).

Nel coniglio è descritto un solo caso positivo (Mantovani) per mezzo di iniezione endovenosa; si contrappongono a questo i risultati negativi di Visentini e Basile, Bandi, Nicolle e Blaizot, Visentini.

Nella cavia, il solo Franchini è riuscito a determinare in un unico animale un'infezione generale da *Leishmania*, mediante una sola iniezione di 1 cc. di cultura nel peritoneo. Ottennero invece risultati negativi per via

endoepatica Laveran; per via endoperitoneale Laveran, Visentini, Nicolle e Blaizot.

Nel topo bianco, mentre Delanoë non ha ottenuto infezione per via peritoneale, gli Yakimoff hanno raggiunto lo scopo iniettando le forme culturali nella vena della coda.

Nel ratto bianco io ho avuto risultati costantemente negativi per via endoperitoneale, in qualche caso sottocutanea ed endovenosa.

Con le colture isolate dai cani spontaneamente infetti sono state compiute invece scarse ricerche e, per giunta, tutte con esito negativo (nel coniglio il Basile per via endoperitoneale e sottocutanea, il Bandi endovenosa; nel *macacus sinicus* Nicolle per via endoperitoneale; nel cane il Basile per iniezioni endoperitoneali e sottocutanee).

Infezione sperimentale del coniglio. — Tre conigli sono stati inoculati nella vena marginale dell'orecchio, ognuno con 5 cc. di liquido di condensazione ricchissimo di flagellati, pari a dieci colture. L'esame ripetuto del sangue è stato sempre negativo. Sacrificati rispettivamente dopo 15, 35, 50 giorni, i conigli non erano diminuiti di peso, nè presentavano *Leishmanie* negli strisci della milza, fegato, polmone, midollo osseo. Il tentativo di ottenere subculture rimase senza successo.

Infezione sperimentale del cane. — Le esperienze nel cane riguardano due cani adulti e quattro cuccioli.

Cane 1. Femmina, adulto, del peso di Kg. 4,600, riceve, il 25 febbraio 1913, una iniezione nella vena giugulare esterna sinistra di 5 cc. di liquido culturale ricchissimo in flagellati, corrispondente a dieci colture dal cane al VI passaggio. Il 30 marzo successivo, reiniezione intraepatica di 4 cc. di coltura al VI passaggio, pari a 10 colture; il 2 aprile, reiniezione endovenosa di 20 colture all'VIII passaggio. Il 2 maggio trapanazione della tibia, negativa; il 3 maggio puntura del fegato, negativa; esame ripetuti del sangue negativi. L'animale viene sacrificato il 12 giugno 1913. Peso Kg. 4,700. All'autopsia la milza si presenta un po' ingrossata, il midollo osseo rosso. Non sono riuscito a trovare *Leishmanie* negli strisci del fegato e della milza, mentre i parassiti erano discretamente abbondanti nel midollo osseo.

Cane 2. Femmina, adulto, peso Kg. 6,200, riceve una sola iniezione di 25 colture al VI passaggio nella vena giugulare il 10 marzo 1913. Esami ripetuti del sangue negativi; puntura del fegato negativa. Viene sacrificato il 1° maggio. Pesa Kg 5,600. All'autopsia, nulla di notevole. Assenza di parassiti all'esame microscopico.

Cane 3 (1). Cucciolo di un mese d'età. Iniettato intraperitoneo con 10 cc. di cultura all'VIII passaggio. Cresce cachettico, magrissimo. Muore spontaneemente dopo 104 giorni. *Leishmanie* discretamente abbondanti nella milza e midollo osseo.

Cane 4. Cucciolo, femmina. Inoculato con 10 cc. di *Leishmania* intraperitoneo e, dopo 15 giorni, con altri 10 cc. di coltura nella giugulare. Ha presentato dissenteria. Non è cresciuto di peso quando viene sacrificato 130 giorni dalla prima iniezione. Milza peso 25 gr. Parassiti numerosi nella milza e nel midollo osseo.

(1) L'esperienza sui cani neonati (3 e seguenti) è stata eseguita in collaborazione con l'allievo interno Guido Castoldi.

Cane 5. Cucciolo maschio. Iniezione endovenosa di 6 cc. di cultura di *Leishmania.* Diarrea, dimagrimento. Leggermente diminuito di peso, viene sacrificato dopo 109 giorni dalla prima iniezione. Organi normali. Milza peso gr. 14. Negli strisci dei varî organi non si riscontrano *Leishmanie.*

Cane 6. Cucciolo maschio. Iniezione endovenosa di 6 cc. di cultura; tre giorni dopo, reiniezione di 7 cc. di *Leishmania.* Distrofia progressiva di massimo grado. Muore dopo 68 giorni dalla prima iniezione. Parassiti di *Leishmania* nella milza in discreto numero.

Cane 7. Cucciolo maschio di controllo. Allevato con lo stesso vitto e nelle stesse condizioni d'ambiente dei precedenti, è cresciuto regolarmente sano e robusto.

Risulta, da queste esperienze, che è possibile di trasmettere al cane, anche adulto, l'infezione da *Leishmania* mediante le forme culturali, specialmente se la via di inoculazione dei protozoi è quella endovenosa.

Anche verso la *Leishmania* proveniente dal cane, come già è noto per quella proveniente dall'uomo, si sono mostrati in modo particolare recettivi i cani nei primi mesi di vita Su quattro animali inoculati, in tre ho riscontrato il protozoo specifico, e la sintomatologia presentata dal quarto, identica a quella degli altri, induce a sospettare che anche questo cane avesse contratto l'infezione.

Il quadro clinico presentato dai cani si poteva con ogni verosimiglianza ravvicinare al quadro clinico che si osserva nei bambini ammalati di Kala-Azar.

Il cane controllo, non inoculato, non ha mai presentato nulla di patologico.

Nel cane adulto, in cui si misero in evidenza *Leishmanie* negli organi ematopoietici, l'infezione decorreva in modo subdolo, senza segni esteriori, con lievi alterazioni macroscopiche degli organi interni.

*
* *

I fatti che risultano dai varî gruppi di ricerche che io ho riferito in questa Nota, non sono privi di interesse, soprattutto per la quistione, dibattuta tra gli studiosi della leishmaniosi del bacino Mediterraneo, circa la identità, o meno, dell'agente specifico che infetta l'uomo ed il cane. Io non intendo entrare nella questione, neppure limitandomi alla esposizione obiettiva dei fatti fin qui accertati; essa è nota ai lettori anche nei dettagli, perchè è oggetto frequente di dibattito scientifico.

Mi limito ora a richiamare l'attenzione sui fatti da me osservati, i quali sarebbero piuttosto argomenti a favore della concezione d'un unico parassita, che infetta l'uomo in India e nel Mediterraneo e, quivi, l'uomo ed il cane.

Row ha coltivato la *Leishmania donovani* nel terreno NNN, ed ha così eliminato una delle principali differenze tra i caratteri culturali di questa e della *Leishmania infantum* Nicolle. Lo sviluppo della *Leishmania* dei nostri paesi nel substrato nutritivo di Row aggiunge una nuova affinità tra i due parassiti.

Le ricerche sulla fina struttura delle forme culturali, e le esperienze di trasmissione dell'infezione, attestano un'identità morfologica e biologica tra il parassita della leishmaniosi spontanea dell'uomo e del cane in Italia.

Io non credo, però, che si debba ad essa dare una soverchia importanza dimostrativa. I protozoi che si coltivano nello stesso mezzo nutritivo possono appartenere alle specie più disparate, ed in modo particolare il substrato NNN si è dimostrato idoneo alla coltivazione di moltissimi flagellati; d'altra parte, i caratteri strutturali del nucleo e dell'apparato motore rappresentano i caratteri fondamentali del genere o della famiglia, piuttosto che quelli della specie.

Si tratta dunque di puri e semplici argomenti a favore, atti comunque ad eliminare differenze spesso invocate dagli avversarî dell'unità parassitaria delle leishmaniosi (uomo e cane) del bacino mediterraneo.

Cristallografia. — *Sull'ematite del Vesuvio* [1]. Nota del dott. Leonardo Cuccia, presentata dal Socio C. Viola.

Allo scopo di aumentare il numero di osservazioni che si prestassero alla determinazione del rapporto assiale dell'ematite, per il quale parecchi cristallografi trovarono valori non perfettamente concordanti, ho studiato un campione di ematite del Fosso di Cancherone (Somma-Vesuvio) esistente nel Museo mineralogico della R. Università di Parma, la cui scheda indicatrice reca la leggenda: « Ferro nativo masiccio (*sic*) mammellonare ed oligisto nella lava di cancherene (*sic*). Vesuvio ».

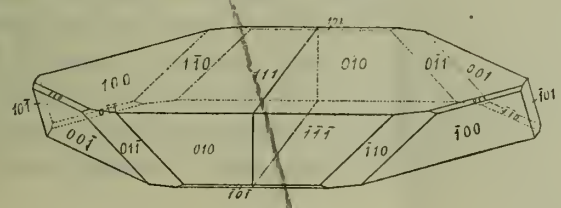

Fig. 1.

In tale campione si vedono cristalli di ematite assai lucenti e ben formati, di un colore grigio di acciaio, che riposano sopra una superficie della scoria lavica porosa, friabilissima, di colore grigio-rossastro.

Dei 20 cristalli scelti per il presente studio — di un diametro variabile da mm. 1 a 4,5 —, diciotto sono geminati; gli altri due cristalli sono semplici.

L'*habitus* d'un geminato, che è rappresentato in proiezione ortogonale dalla fig. 1, è il seguente: tabulare per il prevalente sviluppo delle facce

[1] Lavoro eseguito nell'Istituto di Mineralogia della R. Università di Parma.

del pinacoide basale $c\{111\}$, contornato quasi sempre dalle facce del romboedro fondamentale $r\{100\}$, meno sviluppate delle prime, e da quelle esilissime del romboedro $e\{110\}$ e del prisma $a\{10\bar{1}\}$; non mancando talvolta facce esilissime, appartenenti ad altre forme. Ciascun geminato risulta da un insieme di due individui giustapposti, aventi come asse di geminazione lo spigolo [111]; il piano di associazione, come vedesi dalla figura, è parallelo ad una delle facce del prisma a.

I cristalli semplici, rappresentati in proiezione ortogonale dalla fig. 2, hanno l'aspetto di tavolette molto allungate nel senso dello spigolo $[01\bar{1}]$, che la base ha in comune con una delle facce del romboedro fondamentale: in esse è predominante il pinacoide $c\{111\}$, accompagnato dal romboedro $r\{100\}$, di cui una sola coppia di facce presenta un grande sviluppo secondo

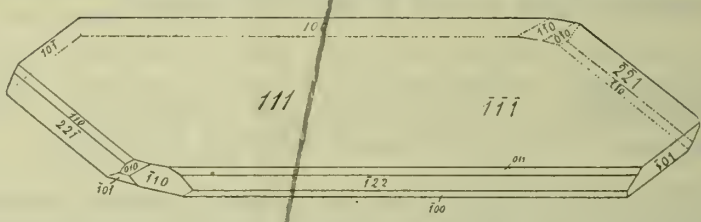

Fig. 2

una sola dimensione. In uno dei due cristalli semplici furono osservate altre forme, oltre alle due accennate.

In ciascun cristallo esaminai col goniometro a riflessione, le tre zone di 1ª specie [011], $[10\bar{1}]$ e $[1\bar{1}0]$, nonchè le tre zone degli spigoli fondamentali [100], [010] e [001], salvo il caso che taluna di tali zone non fosse presente. Solo in qualche cristallo esaminai le zone di 2ª specie, non reputando necessario, per il fine del presente lavoro, esaminare di proposito le zone di 2ª e di 3ª specie, come quelle che, essendo costituite da facce di sviluppo limitatissimo, non davano luogo a immagini vere e proprie, ma a semplici barlumi.

A ciascuna faccia fu assegnato un peso, in base alla immagine in essa formatasi, partendo da un massimo di 10, assegnato alla faccia che dà una immagine netta e precisa del segnale portato dal collimatore.

Le forme osservate sono tutte segnate nella proiezione stereografica, della quale la fig. 3 rappresenta un settore di 120°.

Esse sono le seguenti:

1) Pinacoide basale $c\{111\}$. — Osservato in tutti i cristalli da me studiati, esso si presenta con facce ordinariamente striate nei geminati, lisce nei cristalli semplici. Tali facce sono per lo più costituite da parti di facce, parallele fra loro. Non essendo i loro riflessi molto precisi, non furono prese in conto per la determinazione dell'angolo fondamentale.